

Untersuchungen

über die enzymatische Spaltung von Phosphatiden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu

Frankfurt am Main

Vorgelegt

im Juni 1951

von

Richard Jäger

Frankfurt am Main



1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. W. Diemair

2. Gutachter: Prof. Dr. L. Horner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1951

Vorliegende Arbeit wurde im Universitäts-Institut für Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main auf Anregung des Instituts-Direktors, Herrn Professor Dr. phil. et Dr. ing. W. Diemair ausgeführt.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. W. Diemair für die Übertragung der Arbeit und für seine wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. L. Acker für das rege Interesse das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Über ein phosphatidspaltendes Ferment in Pflanzen.

Von

L. ACKER, W. DIEMAIR und R. JÄGER.

Aus dem Universitäts-Institut für Lebensmittelchemie, Frankfurt am Main-Süd,
Paul Ehrlich-Str. 40 (Leiter: Prof. Dr. Dr. W. DIEMAIR).

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Januar 1952.)

Fast alle tierischen Organe sind zum Aufbau von Phosphatiden befähigt. Die Kenntnis über die Phosphatidsynthese und insbesondere über die quantitativen Unterschiede in den synthetischen Leistungen der einzelnen Organe verdanken wir „Tracer“-Untersuchungen mit P^{32} , vornehmlich aus den Arbeitskreisen von G. HEVESY und I. L. CHAIKOFF. Die Fähigkeit tierischer Gewebe zum Abbau von Phosphatiden war schon früher bekannt[1] und ist inzwischen auch weiter untersucht worden, wenn man auch über die Einzelheiten des Abbaumechanismus noch keine einheitlichen und eindeutig gesicherten Vorstellungen besitzt[2]. Dagegen weiß man von der Phosphatidspaltung durch pflanzliche Gewebe noch sehr wenig. Zwar kennt man Phosphodiesterasen z. B. in Reiskleie), aber ihre Wirksamkeit scheint lediglich an Diphenylphosphat geprüft worden zu sein. Nur S. AKAMATSU[3] ließ Takadiastase auf Eigelblecithin einwirken und konnte nach 10tägiger Reaktionsdauer eine Aufspaltung, gemessen an der Aciditätserhöhung und der Zunahme der anorganischen Phosphorsäure, feststellen. Die erste größere Untersuchung über pflanzliche Phosphatidasen stammt wohl von D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF[4], die, durch wechselnde Ausbeuten an Phosphatiden aus Karotten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung aufmerksam geworden[5], die phosphatidspaltende Wirkung des Karottenextraktes erkannten. Sie ließen Karottenextrakt auf Sojaphosphatide einwirken, trennten nach Bebrütung bei pH 5,9 das ungespaltene Phosphatid durch Ätherextraktion ab und bestimmten darin N, Cholin und P. Eine Abspaltung von Fettsäuren wurde nicht beobachtet; der Angriff des Fermentes soll primär an der Phosphorsäure-Cholin-Bindung einsetzen, es soll aber auch aus Kephalin Colamin freimachen können.

Dieses Ferment ist auch in Kohlblättern von den gleichen Forschern nachgewiesen worden[6]. W. G. ROSE[7] hat, veranlaßt durch diese Befunde, die Spaltungsaktivität der Extrakte aus Karotten und Kohlblättern durch Bestimmung des freigesetzten Colamins bzw. Serins mit

Perjodat, das sowohl mit Colamin als auch mit Serin unter Bildung von NH_3 reagiert, gemessen. Er hat bei Karotten keine kephalinspaltende Wirkung beobachtet, sondern nur bei Kohlblättern. Die Tatsache, daß aus synthetischem Kephalin kein Colamin erhalten werden konnte, wurde so gedeutet, daß das Enzym nur spezifisch auf Serinkephalin wirke. Ob dieser Schluß berechtigt ist, erscheint zweifelhaft, nachdem bereits E. CHARGAFF früher [8] gezeigt hatte, daß Kephalin, aus Eigelb isoliert, von Lecithinase A aus Schlangengift nicht angegriffen wird, während es im natürlichen Verbands aufgespalten wird.

D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF haben ursprünglich eine Beziehung zur Cholinesterase vermutet, aber dann gefunden, daß der Extrakt Acetylcholin nicht spaltet. Auf die an sich näher liegende Beziehung zu den Phosphatasen sind die Autoren nicht eingegangen. Das Ziel der Arbeit war es, Vorkommen und Wirkungsweise dieses Fermentsystems zu untersuchen. Dabei sollte der Grad der Aufspaltung nicht an der Menge des ungespaltenen, d. h. ätherlöslichen Phosphatid-N, sondern an der Zunahme des wasserlöslichen Cholins verfolgt werden. Zur Kontrolle wurde aber auch im Ätherextrakt nach der Hydrolyse das Cholin bestimmt.

Experimenteller Teil.

Cholinbestimmung. Zur Bestimmung des Cholins erwies sich nach umfangreichen Vorversuchen die Methode nach W. ROMAN [9] als besonders geeignet. Sie beruht auf der Fällung des Cholins als Enneajodid und der titrimetrischen Ermittlung des Jodgehalts der Fällung. Bei den enzymatischen Versuchen waren die Cholinmengen etwa in der Größenordnung von 0,01—1 mg zu erwarten, wobei das Cholin nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches als Chlorid in schwach salzsaurer Lösung vorlag. Nach einer größeren Anzahl von Probeanalysen mit Lösungen von Cholinchlorid (purum medicinale, Merck) entsprechender Konzentration ergab sich, in geringfügiger Abänderung der Originalvorschrift, folgendes Verfahren:

Das Cholin wird aus 0,5—2 cm³ Lösung mit 0,3 cm³ einer Reagenslösung in Zentrifugenspitzgläsern gefällt, die 157 g Jod und 200 g Kaliumjodid in 1 l enthält. Nach der Fällung bleiben die Gläser 10 min lang in einer Eis-Kochsalz-Kältemischung zur Vervollständigung der Fällung stehen. Der Niederschlag wird scharf abzentrifugiert (3000 U/min, 5 min) und die überstehende Flüssigkeit durch ein ALLIHNsches Röhrchen mit Glasfrittenfilter (15G4) abgossen. Der Niederschlag wird ohne Aufwirbeln 4—5 mal mit je 2 cm³ Eiswasser gewaschen und die Waschflüssigkeit durch das Filterröhrchen abgossen. Dann löst man den Jodidniederschlag in Alkohol, nimmt etwa in das Filterröhrchen gespülte Teile des Niederschlages mit Alkohol auf und vereint beide Lösungen in einem ERLÉNMEYER-Kolben von 100 cm³. Nach Zusatz von 0,5 g Kaliumjodid und Verdünnung mit Wasser wird mit n/100 Natriumthiosulfatlösung titriert (StärkeLösung als Indicator).

Bei den orientierenden Reihenversuchen zeigte es sich, daß nur bei genauer Einhaltung der genannten Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Um das Verdampfen und Auflösen des auf das Filter gelangten Enneajodidniederschlages möglichst zu vermeiden, wird das Filterröhrchen mit einem Kühlmantel aus Glas umgeben, so daß beim Filtrieren und Abgießen der Waschflüssigkeit mit einer Eis-Kochsalz-Kältemischung gekühlt werden kann. Über die Schwankungsbreite

der Methode in den verschiedenen Konzentrationsbereichen unterrichtet die Tab. 1, die Werte aus insgesamt 98 Analysen bringt.

Tabelle 1.

Übersicht über die Fehlerbreite bei der Cholinbestimmung nach ROMAN.

Konzentrations- bereich mg Cholin/cm ³	Zahl der Analysen	Zahl der Analysen mit Abweichungen von				Mittlere Abweichung vom theo- retischen Wert
		1 %	2 %	3 %	4—6 %	
1 —5	21	6	5	5	5	2,9 %
0,05—1,0	50	18	16	16	—	1,96 %
0,01—0,05	27	8	5	6	8	3,1 %

Es ist zu ersehen, daß die Bestimmung bei Konzentrationen bis zu 0,01 mg/cm³ innerhalb der in der Literatur angegebenen Fehlergrenze von 5% möglich ist. Als für die Bestimmung besonders günstig erwies sich der Konzentrationsbereich zwischen 0,05—1,0 mg/cm³.

Das colorimetrische Cholinbestimmungsverfahren nach F. R. J. BEATTIE [10], das auf der Ausfällung des Cholins als Reineckat und anschließender colorimetrischer Bestimmung der Reineckatlösung in Aceton beruht, erwies sich bei den zu erwartenden geringen Cholinmengen als weniger geeignet.

Enzymatische Spaltung von Phosphatiden.

Spaltungsversuche mit Karottenpreßsaft. Das bei den Spaltungsversuchen als Substrat dienende Phosphatid wurde aus getrockneter Nährhefe (*Torula utilis*, Zellstoffwerke Waldhof) in der von W. DIEMAIR und J. KOCH [11] angegebenen Weise gewonnen. In diesem Phosphatid wurde nach Hydrolyse mit 3%iger Salzsäure und Reinigung des Hydrolysats ein Cholingehalt von 6,48% ermittelt, der einem Lecithingehalt von 42% entspricht.

Die Gewinnung spaltungsaktiver Lösungen erfolgte zunächst, wie von D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF angegeben, durch Extraktion gut zerkleinerter Karotten mit Wasser; nach den ersten Vorversuchen wurde jedoch die enzymatisch wirksame Lösung ausschließlich durch Auspressen des zerkleinerten Materials gewonnen. Die Preßsäfte zeigten im allgemeinen eine höhere Wirksamkeit als die wäßrigen Auszüge.

Bei den folgenden Versuchen wurde nach I. L. CHAIKOFF und Mitarbeitern zur Messung der enzymatischen Wirksamkeit in einem ERLLENMEYER-Kolben eine genau abgewogene Menge von etwa 80 mg Phosphatid in 2,5 cm³ Phosphatpufferlösung von pH 5,8 emulgiert. Zur Emulsion wurden 5 cm³ des wirksamen Karottenextraktes oder -preßsaftes hinzugefügt; nach Zugabe von 1 Tropfen Chloroform oder Toluol wurde kräftig umgeschüttelt und das Reaktionskölbchen im Brutschrank bei 25° C 24 Std lang stehengelassen. Hierauf wurde die Emulsion 3mal 15 min lang mit je 15 cm³ Äther ausgeschüttelt. Das abgespaltene Cholin bleibt in der wäßrigen Reaktionslösung zurück, in

der Ätherschicht findet sich das nicht umgesetzte Phosphatid neben ätherlöslichen Spaltprodukten. Die Bestimmung des Cholins im Ätherextrakt erfolgte nach dem Abdampfen des Äthers auf dem Wasserbade und Hydrolyse mit 3%iger Salzsäure in der beschriebenen Weise.

Durch Vorversuche war festgestellt worden, daß ein 3maliges Ausschütteln zur erschöpfenden Extraktion der Phosphatide ausreichte. Vor dem Ausschütteln wurde die Lösung mit verd. HCl schwach angesäuert (p_H 3—4), um zu verhindern, daß sich das abgespaltene Cholin in Form des ätherlöslichen Cholinsalzes der Phosphatidsäure der Bestimmung in der wäßrigen Lösung entzieht.

Die Bestimmung des Cholins in der wäßrigen Reaktionslösung, auf die I. L. CHAIKOFF verzichtet hatte, gestaltete sich wesentlich schwieriger, da hier erhebliche Verunreinigungen, besonders Eiweißstoffe, aus dem Karottenextrakt störend wirkten. Zunächst wurde der noch im Reaktionsgemisch gelöste Äther durch Erhitzen auf dem Wasserbade entfernt, die Lösung nach Abkühlen auf 25 oder 50 cm³ aufgefüllt und dann 10 min lang kräftig zentrifugiert (5000 U/min), wobei sich alle gröberen Verunreinigungen absetzten. Die klare oder höchstens opaleszierende Flüssigkeit wurde durch Ultrafiltration (Membranfilter Nr. 2 der Membranfiltergesellschaft Göttingen) noch weiter gereinigt. In der so erhaltenen völlig klaren Lösung kann das Cholin ohne Störung bestimmt werden.

Der Karottenextrakt enthält geringe Mengen an Cholin, die in einer Blindprobe festgestellt und bei der Bestimmung des enzymatisch abgespaltenen Cholins in Abzug gebracht werden müssen. Bei dieser Blindprobe werden auch alle noch etwa vorhandenen Stoffe erfaßt, die mit der konzentrierten Jodlösung reagieren und so einen höheren Cholin Gehalt vortäuschen könnten.

Bei der Aufarbeitung der Versuchsansätze wirkte zunächst die starke Verunreinigung des Preßsaftes durch Zellbestandteile störend, die durch Zentrifugieren zum großen Teil beseitigt werden können. Eine weitergehende Reinigung ist durch Zusatz von 18—20 g Ammoniumsulfat auf 100 cm³ Preßsaft möglich. Dieses wird langsam in den vorgereinigten Preßsaft eingerührt und die Lösung dann 10 min lang stehen gelassen. Ein dabei auftretender brauner, flockiger Niederschlag wird abzentrifugiert. Die überstehende Lösung ist nahezu klar und schwach gelbbraun gefärbt. Eine Verminderung der enzymatischen Wirksamkeit tritt durch diese Behandlung nicht ein.

Auch durch Zusatz von 10—15 Vol% Aceton ist eine gute Vorreinigung der Enzymlösung ohne Verminderung der Aktivität zu erreichen, höhere Konzentrationen dagegen schwächen die Wirkung. Eine Vorreinigung mit Aceton ist derjenigen mit Ammoniumsulfat vorzuziehen.

Die ersten Spaltungsversuche wurden mit Preßsäften aus verschiedenen Karottensorten durchgeführt. Die Aktivität der Preßsäfte, ausgedrückt in Prozent Cholin (bezogen auf das in dem betreffenden Phosphatid enthaltene Gesamtcholin, Spaltungsgrad) und in Prozent abgespaltenes Cholin der Einwaage (Tab. 2), zeigt starke Schwankungen. Die gleichzeitige Bestimmung des „ätherlöslichen“ Cholins, d. h. des nach der Hydrolyse aus dem Ätherextrakt gewonnenen Cholins, stellt eine gute Kontrolle dar.

Reinigung der Enzymlösung und Darstellung eines Enzymtrocken-Präparates. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist und wie bei weiteren Untersuchungen festgestellt wurde, zeigten Preßsäfte aus verschiedenem Ausgangsmaterial eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit.

Tabelle 2.

Enzymatische Cholinabspaltung beim Hefephosphatid durch Karottenpreßsaft.

Phosphatid mg	Cholin %		Spaltungs- grad %	Substrat	Zeit Std
	wasser- löslich	äther- löslich			
89,2	4,5	0,87	79	Phosphatid mit 5,8% Cholin	24
78,4	4,9	0,98	86	„	„
83,4	5,66	0,52	89,5	„	„
86,5	3,47	2,33	60	„	„
84,2	4,48	—	77	„	„
77,8	3,05	2,4	52,6	„	„
99,4	1,62	4,6	27	Phosphatid mit 6,3% Cholin	„
98,0	2,33	4,05	35,4	„	„
78,6	4,2	—	66,6	„	„
84,5	4,1	2,77	58,7	„	„

Manche Karottensorten erwiesen sich für den vorliegenden Zweck als ungeeignet. Auf Grund längerer Versuchsreihen ließ sich weiterhin feststellen, daß nicht nur eine Abhängigkeit von der Sorte, sondern auch vom Reifezustand der Karotten besteht. Preßsäfte aus jungen Karotten, die im Frühjahr geerntet worden waren, erwiesen sich oftmals als kaum aktiv bzw. inaktiv, im Gegensatz zu im Herbst geernteten, ausgereiften Karotten. Der Befund von W. G. ROSE[7], daß Karotten keine phosphatidspaltende Aktivität zeigen sollen, findet damit eine gute Erklärung. Der Cholingehalt der Preßsäfte war ebenfalls unterschiedlich und schwankte zwischen 3 und 10 mg in 100 cm³. Hochwirksame Preßsäfte wiesen im allgemeinen auch einen höheren Cholingehalt auf als weniger aktive. Bei Vergleichsversuchen über die Kinetik der Spaltung ist diese unterschiedliche Wirksamkeit sehr störend. Dazu kommt noch die geringe Haltbarkeit des rohen Preßsaftes, welche die Bereitstellung

größerer Mengen mit gleichbleibender Wirksamkeit unmöglich macht. D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF wiesen bereits darauf hin, daß Enzymextrakte, die älter als 24 Std sind, nicht mehr verwendbar sind. Nach unseren Versuchen können Preßsäfte auch nach Aufbewahrung über 24 Std im allgemeinen noch verwendet werden, wenn die Aufbewahrung im Kühlschrank nach Zusatz von Chloroform oder Toluol erfolgt. Bei längerer Aufbewahrungszeit (2—8 Tage) sinkt die Wirksamkeit jedoch mehr oder weniger rasch ab.

Aus den angeführten Gründen erschien es wünschenswert, für weitere Versuche eine Reinigung der Enzymlösung vorzunehmen und diese in eine haltbare Form bei gleichbleibender, definierter Wirksamkeit überzuführen. Die zu diesem Zweck untersuchten Verfahren sind in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Die ersten Versuche befaßten sich mit einer Anreicherung der wirksamen Substanz durch Gefrierpressung. Zu diesem Zweck wurde frischer Karottenpreßsaft ohne irgendwelche Vorbehandlung in einem Becherglas in eine Kohlensäure-Aceton-Kältemischung eingebracht und so lange gerührt, bis er gleichmäßig zu einer krümelig-plastischen Masse durchgefroren war. Diese wurde in einen starkwandigen Eisenzylinder mit mehrfach durchlochter Wandung eingetragen und mit einer Spindelpresse kräftig abgepreßt. Die ablaufende Flüssigkeit war — wahrscheinlich durch die Berührung mit dem Eisen der Preßapparatur bedingt — stark dunkelbraun verfärbt. Die mit dem Gefrierpreßsaft erzielten Versuchsergebnisse sind aus Tab. 3 ersichtlich.

Tabelle 3. Die Wirksamkeit von Gefrierpreßsaft.

Enzymlösung	Phosphatid mg	Cholin %		Spaltungs- grad %	Zeit Std
		äther- löslich	wasser- löslich		
Gefrierpreßsaft 5 cm ³ . . .	73,7	4,07	1,8	28,6	24
„ „	79,8	5,21	1,0	16	24
Preßsaft unbehand. 5 cm ³ .	80,4	2,18	3,9	62	24

Die Wirksamkeit des Gefrierpreßsaftes ist demnach im Vergleich zu unbehandeltem Material stark vermindert, besonders wenn man berücksichtigt, daß die durch die Gefrierpressung erzielte Anreicherung des Saftes unberücksichtigt blieb. Offenbar erfolgte eine Inaktivierung durch Metalleinflüsse.

Ein Enzympräparat, das den genannten Anforderungen genügte, konnte nach langwierigen Versuchen mit Hilfe der Hochvakuum-Gefriertrocknung gewonnen werden. Dafür stand eine einfache Laboratoriumsapparatur zur Verfügung (Abb. 1). Sie besteht aus einem zylindrischen Glaskolben von etwa 400 cm³ Inhalt mit eingeschmolzenem,

bis auf den Boden des Kolbens reichendem Glasrohr, das an die Saugseite einer entsprechenden Pumpenanordnung angeschlossen wird. Auf den Kolbenhals ist ein T-Stück aufgesetzt, auf dessen freie Enden mittels Normalschliff je ein Rundkolben von 250—500 cm³ Inhalt aufgesetzt werden kann.

Die Gefriertrocknung wurde folgendermaßen durchgeführt: 100 cm³ Preßsaft wurden mit 10 cm³ Aceton vorbehandelt und in die beiden Rundkolben eingefüllt, die in einer Kohlensäure-Aceton-Kältemischung gekühlt wurden. Durch andauernde langsame Drehung der Kolben wurde ein gleichmäßiges Einfrieren des Inhalts in dünner Schicht an der Kolbeninnenwand erreicht. Die beiden Rundkolben wurden auf das T-Stück der Apparatur aufgesetzt, der zylindrische Kolben bis zum Rohransatz in Kohlensäure-Aceton-Kältemischung eingetaucht und die Apparatur evakuiert. Bei einem Vakuum von 10⁻³ Torr nahm die Trocknung von 100 cm³ Preßsaft etwa 5 Std in Anspruch.

Das Trockenprodukt ist ein gelbliches bis hell orangefarbiges, hygroskopisches Pulver, das sich in Wasser zu einer orangefarbenen, schwach trüben Flüssigkeit löst.

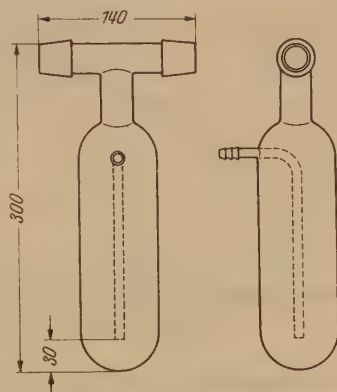


Abb. 1. Apparatur für Gefriertrocknung.

Frischer, unbehandelter Preßsaft hatte eine Trockensubstanz von 0,92—0,96 g in 10 cm³, mit Aceton vorbehandelter Preßsaft einen solchen von 0,73—0,75 g in 10 cm³. Eine Auflösung von 0,7 g Trockenextrakt in 10 cm³ Wasser besaß die gleiche enzymatische Wirksamkeit wie 10 cm³ des ursprünglichen Preßsaftes, so daß also durch die Gefriertrocknung keine merkliche Inaktivierung eingetreten war. Für alle weiteren Versuche wurden je 10 cm³ dieser Trockenextraktlösung verwendet. Eine Übersicht über die erzielte Wirksamkeit gibt Tab. 4.

Tabelle 4.

Spaltungsversuche mit Enzymtrockenpräparaten aus verschiedenen Karottenlieferungen (jeweils 0,7 g in 10 cm³).

Phosphatid mg	Cholin %		Spaltungs- grad %	Zeit Std
	ätherlöslich	wasserlöslich		
80,5	0,89	5,3	83	24
84,4	1,3	5,9	80	24
87,0	—	5,46	84	24
80,0	—	4,8	75	24

Kinetik der Phosphatidspaltung. Mit dem nunmehr zur Verfügung stehenden einheitlichen Enzymmaterial konnte die Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Cholinabspaltung aus Phosphatid zuverlässig

erfolgen. Tab. 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, während Abb. 2 den zeitlichen Verlauf der Cholinabspaltung zeigt. Zur Klärung der Frage, welche Reaktionsordnung die Cholinabspaltung besitzt, wurden die Konstanten der Reaktion 1. Ordnung für die einzelnen Ansätze berechnet; die Werte finden sich ebenfalls in Tab. 5. Nach den Ergebnissen sind die so ermittelten Werte für K innerhalb der Versuchsfehler konstant (die ersten beiden Werte fallen etwas

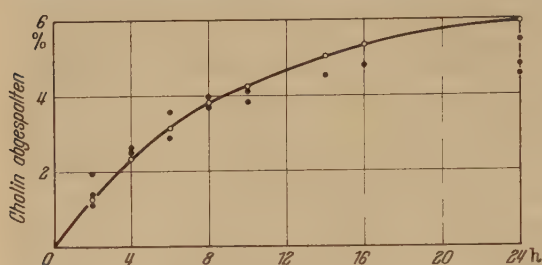


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Phosphatidspaltung. ● Meßwerte, ○ ber. für eine Reaktion 1. Ordnung mit $K = 3,13 \cdot 10^{-5}$

heraus), jedenfalls während der ersten 10 Std. Aus dem für diesen Zeitraum sich ergebenden Mittelwert von $K = 3,13 \cdot 10^{-5}$ wurde der Verlauf einer Reaktion 1. Ordnung berechnet. Diese Kurve gibt den Verlauf der Spaltung in den ersten 10 Std mit befriedigender Genauigkeit wieder; demnach läuft die Cholinabspaltung als Reaktion 1. Ordnung ab. Im späteren Verlaufe sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit etwas ab, was auf einer Hemmung durch die Reaktionsprodukte beruhen kann. In diesem Zusammenhang ist die Feststellung bemerkenswert, daß Cholin in 0,033 molarer Konzentration eine Hemmung der enzymatischen Cholinabspaltung bewirkt.

Tabelle 5. Versuche zur Kinetik der Cholinabspaltung mit Enzymentrockenpräparat.

Phosphatid mg	Abgespaltenes Cholin %	$K \cdot 10^{-5}$ $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Zeit Std
80,6	1,11	2,62	2
77,2	1,12	2,74	2
82,8	1,35	3,27	2
81,4	2,65	3,51	4
81,3	2,51	3,48	4
81,0	2,9	2,78	6
82,4	3,58	3,78	6
83,0	3,73	3,02	8
83,2	3,93	3,23	8
81,3	4,16	2,79	10
83,4	3,83	2,77	10
81,6	3,31	2,42	14
81,6	4,54	2,4	14
80,0	4,8	2,4	16
87,0	5,46	2,23	24
82,2	4,91	2,1	24

p_H-Abhängigkeit der Aktivität. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die p_H-Abhängigkeit der Enzymwirkung verfolgt. Die Einwirkungsdauer betrug einheitlich 4 Std, die Einstellung der einzelnen p_H-Werte erfolgte mit Citronensäure, Citratpufferlösung und n/10 KOH. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 graphisch aufgetragen.

Der flacher verlaufende Kurvenast liegt auf der Seite der kleineren p_H-Werte, das Wirkungsoptimum etwa bei p_H 5,8. Außerhalb des

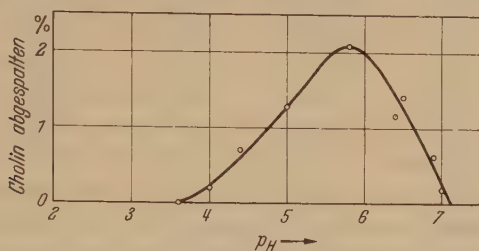


Abb. 3. p_H-Abhängigkeit der enzymatischen Phosphatidspaltung.

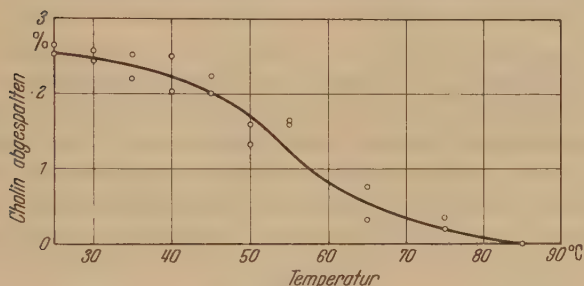


Abb. 4. Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Phosphatid-Spaltung.

Bereiches von p_H 3,5—7,0 war das Ferment unwirksam. D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF hatten bei ihren Versuchen eine optimale Wirksamkeit zwischen p_H 5,2 und 5,9 gefunden, bei einem Wirkungsbereich von p_H 2,0—8,5.

Temperaturabhängigkeit der Aktivität. Bei Blindversuchen mit hitze-inaktivierten Preßsäften waren gelegentlich noch geringfügige Cholinabsaltungen zu beobachten. Diese Erscheinung konnte durch Versuchsfehler bedingt sein, wenn nicht das Ferment in hohem Grade thermostabil ist. Der Einfluß der Reaktionstemperatur auf die enzymatische Wirksamkeit wurde im Temperaturbereich zwischen 35 und 85° C untersucht. Die Phosphatidemulsion wurde auf Reaktionstemperatur vorgewärmt. Das Reaktionsgemisch wurde dann 4 Std lang bei p_H 5,8 (Citratpufferlösung) im Thermostaten bei der betreffenden Temperatur gehalten. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengestellt; Abb. 4 zeigt den Verlauf der Temperaturabhängigkeit.

Tabelle 6.

Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität eines Karottenpräparates.

Reaktions- temperatur	% Cholin abgespalten		Spaltungs- grad %
25°	2,51	2,65	40,2
30°	2,45	2,58	38,6
35°	2,2	2,51	35,6
40°	2,04	2,5	35,0
45°	2,01	2,23	32,5
50°	1,32	1,6	20,7
55°	1,6	1,64	24,6
65°	0,32	0,76	7,7
75°	0,2	0,35	3,8
85°	0	0	0

Bemerkenswert ist der flache Verlauf der Temperaturkurve. Das Temperaturoptimum ist wenig ausgeprägt und liegt etwa zwischen 25° und 35° C. Ferner wurden 10 cm³ Enzymlösung 1 Std lang auf 85° C erwärmt und dann zu der Phosphatidemulsion zugesetzt; dabei zeigte sich dann keine enzymatische Wirksamkeit mehr.

Versuche zur Anreicherung und Reinigung der Enzymlösung. Bereits bei der Beschreibung der Klärung des Karottenpreßsaftes wurde erwähnt, daß eine Behandlung desselben mit 18—20% Ammoniumsulfat eine gewisse Reinigung bewirkt und daß hierbei noch keine Verminderung der Wirksamkeit eintritt; es läßt sich sogar vielfach eine Verbesserung der Haltbarkeit beobachten. Auch bei einer Konzentration von 25% Ammoniumsulfat ist die enzymatische Wirksamkeit noch kaum ver-

Tabelle 7.

V Versuchsergebnisse der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat.

Ver- suchs- reihe	Art der Behandlung der Enzymlösung	Cholin %		Spal- tungs- grad	Zeit Std
		äther- löslich	wasser- löslich		
1	Preßsaft unbehandelt	4,89	1,03	16	2
1	Preßsaft + 25% (NH ₄) ₂ SO ₄ zentrifugiert	5,15	1,19	18,5	2
1	Fällung mit 25% (NH ₄) ₂ SO ₄ Nd. in Wasser gelöst	6,33	0	0	2
1	Desgl., Nd. in inaktiv. Preßsaft gel. . . .	6,4	0	0	2
2	Fällung mit 30% (NH ₄) ₂ SO ₄ Nd. in Wasser gel.	6,4	0	0	2
2	Desgl., Nd. in inaktiv. Preßsaft gel. . . .	5,8	0,61	9,4	2
3	Preßsaft ges. mit (NH ₄) ₂ SO ₄ Nd. in Wasser gel.	6,17	0	0	2
3	Desgl., Nd. in inaktiv. Preßsaft gel. . . .	5,86	0,72	11,1	2
4	Preßsaft + 25% (NH ₄) ₂ SO ₄ zentrifugiert	3,58	2,48	38	2
4	Desgl.	3,74	2,43	37,5	2
4	Preßsaft ges. mit (NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	0,2	3	2

mindert. Bei einem weiteren Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur Sättigung der Lösung wurde eine weitere Fällung erhalten. Diese wurde abzentrifugiert und teils in Wasser, teils in durch 5 min langes Erhitzen inaktiviertem Preßsaft gelöst. Die überstehende Lösung erwies sich als unwirksam. Die rein wäßrige Lösung des Niederschlages war immer inaktiv, hingegen war bei Auflösung in hitzeinaktiviertem, filtriertem Preßsaft noch eine schwache Aktivität festzustellen.

Tab. 7 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Versuchsansätze mit Ammoniumsulfat. Die einzelnen Versuchsreihen wurden mit Preßsäften aus verschiedenen Karottenlieferungen und daher unterschiedlicher Aktivität durchgeführt.

Phosphatidspaltende Fermente in anderen Pflanzen und Fermentpräparaten. Der hohe Gehalt an Phosphatidsäuren in Spinatblättern [12] ließ vermuten, daß auch in diesem Material phosphatidspaltende Fermente vorhanden sein könnten. Preßsaft aus Spinatblättern zeigte jedoch keine enzymatische Wirksamkeit. Extrakte aus gekeimtem Weizen waren schwach spaltungsaktiv. Die Untersuchungen über die phosphatidolytische Wirksamkeit von Extrakten aus Cerealien gehen weiter.

Die von S. AKAMATSU aufgefundene Abspaltung von Phosphorsäure aus Lecithin durch Takadiastase wurde bereits erwähnt [3]. Da eine Abspaltung von Phosphorsäure ohne vorhergehende Cholinabspaltung auf Grund der Konstitution des Phosphatidmoleküls nicht möglich ist, wurde auch die Phosphatidspaltung durch Takadiastase untersucht und an der Menge des freigesetzten Cholins verfolgt.

Die Versuchsergebnisse zeigt Tab. 8, aus welcher zu entnehmen ist, daß Takadiastase bei einem Verhältnis Enzym : Substrat = 1 : 10 eine deutliche Abspaltung von Cholin aus Phosphatid bewirkt. An der lecithinspaltenden Eigenschaft der Takadiastase dürfte damit kein Zweifel bestehen.

Tabelle 8. *Phosphatidspaltung durch Takadiastase.*

Phosphatid mg	Cholin %		Spaltungsgrad %	Zeit Std
	ätherlöslich	wasserlöslich		
80,8	6,19	0,2	ca. 3	24
81,1	5,1	1,41	21,7	72

Beziehungen des phosphatidspaltenden Fermentes zu Phosphatasen. D. J. HANAHAN und I. L. CHAIKOFF haben bei ihren Untersuchungen keine weitere Aufspaltung, etwa unter Freiwerden von Fettsäuren oder Phosphorsäure, beobachtet, was sie zur Annahme führte, daß lediglich die Cholin-Phosphorsäurebindung angegriffen würde. Ihre Vermutung, daß hierfür eine Cholinesterase verantwortlich sein könnte, hatte sich

jedoch nicht bestätigt. Nun ist es jedoch naheliegend, die Gegenwart einer Phosphodiesterase anzunehmen, die aus dem Phosphatidmolekül zunächst Cholin (und auch Colamin) abspaltet. Daß bei der — wie sich später erwies — stark phosphatatischen Wirksamkeit des Karottenextraktes keine Phosphorsäure aus der gebildeten Glyceridphosphorsäure abgespalten werden sollte, erschien uns unwahrscheinlich. Allerdings war auch vorstellbar, daß beim ersten Angriff Phosphorylcholin freigelegt würde, das dann durch eine Cholinphosphatase weiter hydrolysiert werden könnte. Reaktionskinetisch war allerdings zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht zu entscheiden.

Das Trockenpräparat und Takadiastase wurden zur Klärung dieser Frage auf verschiedene Substrate einwirken gelassen: Phosphorylcholin (Phosphorsäurecholinester) und Natrium- β -glycerophosphat. Das Phosphorylcholin wurde nach bekanntem Verfahren hergestellt [13]. Diese Verbindung ist für Versuche zur enzymatischen Cholinabspaltung insofern gut geeignet, als deren Calciumsalz in wäßriger Lösung nicht mit den üblichen Cholinreagenzien (Jodjodkaliumlösung, REINECKE-Salz) reagiert — was für eine Betainstruktur dieser Verbindung spricht —, so daß das abgespaltene Cholin neben dem nicht umgesetzten Anteil des Phosphorylcholins bestimmt werden kann. Die Durchführung der einzelnen Versuche erfolgte in gleicher Weise und mit gleicher Fermentkonzentration wie beim Phosphatidversuch.

Aus Tab. 9, Versuch Nr. 11—15, geht hervor, daß durch das Karottenenzympräparat Phosphorylcholin bei einem pH 5,8 in 24 Std quantitativ aufgespalten wird. Auch durch Takadiastase ist bei einem Verhältnis Enzym : Substrat = 1 : 10 eine weitgehende Aufspaltung zu beobachten. Wenn bei der Einwirkung auf das Phosphatid primär Phosphorylcholin abgespalten würde, so wäre nach den obigen Ergebnissen mit einer weiteren Aufspaltung in Phosphorsäure und Cholin zu rechnen. Dabei verläuft, wie man aus diesen Befunden schließen darf, die Hydrolyse des Phosphorylcholins rascher als die Phosphatidspaltung. Wenn nun tatsächlich in erster Phase Phosphorylcholin abgetrennt würde, so müßten in der Reaktionslösung Cholin und Phosphorsäure in gleichen molekularen Verhältnissen vorliegen, oder anders ausgedrückt: der Spaltungsgrad des Phosphatids, berechnet nach dem abgespaltenen Cholin, müßte gleich sein demjenigen aus der abgespaltenen Phosphorsäure. Es wurde daher die Phosphorsäure in der wäßrigen Phase (unter Berücksichtigung des Blindwertes des Karottenpräparates), bei anderen Versuchen aber auch im Rückstand des Ätherextraktes nach Mineralisierung ermittelt. In allen Fällen (Tab. 9, Nr. 7—10) wurde beobachtet, daß die Spaltungsgrade so deutlich verschieden waren, daß die Unterschiede weit außerhalb der Schwankungsbreite der Bestimmungsmethode lagen. Damit ist also die Möglichkeit der Auftrennung des Phosphatid-

moleküls in Diglycerid und Phosphorylcholin sehr unwahrscheinlich. Das Enzym greift primär an der Cholin-Phosphorsäure-Bindung an, worauf die gebildeten Phosphatidsäuren durch Phosphatasen weiter abgebaut werden. Die verhältnismäßig rasche weitere Aufspaltung macht es verständlich, daß es nicht zur Anhäufung von Phosphatidsäuren im Karottenextrakt kommt.

Die Bestimmung der Glycerophosphatasewirksamkeit erfolgte in bekannter Weise durch Bestimmung der freigesetzten Phosphorsäure nach EMBDEN. Unter Berücksichtigung des Blindwertes des Karottenpräparates (3,02 mg P in 0,7 g Trockenpräparat) ist, wie aus Tab. 9, Versuch Nr. 1—3 ersichtlich, diese Aktivität recht erheblich. Man darf wohl annehmen — ohne daß dies aus unseren Untersuchungen sich zwingend ergeben würde —, daß die Spaltung von Glycerophosphat und Phosphorylcholin auf ein einziges Enzym zurückgeht. Ob das gleiche Enzym auch die erste Abspaltung von Cholin bewirken könnte, sollte in einem Versuch geklärt werden, dem folgender Gedankengang zugrunde lag: Ist für die Spaltung von Phosphorsäureestern nur ein einziges Enzym zuständig, dann müßte ein Takadiastasepräparat von der gleichen Glycerophosphataseaktivität wie eine bestimmte Menge von Karottentrockenpräparat unter den gleichen Versuchsbedingungen die gleiche Aufspaltung von Phosphatid herbeiführen.

Tabelle 9.

Einwirkung von Takadiastase und Karottenenzympräparat auf verschiedene Substrate.
Substrate: NGP = Natrium- β -glycerophosphat mit 15,96% P. Ph = Phosphatid mit 6,48% Cholin und 3,39% P. PC = Phosphorylcholin mit 39% Cholin. Enzym: T = Takadiastase. K = Karottentrockenpräparat. KPr = Karottenpreßsaft.

Nr.	Substrat mg	Enzym- präparat	Cholin		Phosphor		Spaltungs- grad %		Zeit Std
			wasser- löslich %	äther- löslich %	wasser- löslich %	äther- löslich %	nach Cholin ber.	nach P ber.	
1.	NGP 20,0	K 0,7 g			7,82			49	4
2.	NGP 20,0	K 0,7 g			7,75			48,5	4
3.	NGP 20,0	T 9,5 mg			6,95			43,5	4
4.	Ph 81,3	T 9,5 mg	—	6,39	—	—	0		4
5.	Ph 80,8	T 9,5 mg	0,2	6,19			ca. 3		24
6.	Ph 80,0	T 9,5 mg	0,2	—	0,03	—	ca. 3		24
7.	Ph 80,0	K 0,7 g	1,89	—	0,36	—	29,2	10,6	4
8.	Ph 87,6	KPr	5,18	0,6	—	1,54	80,2	45,5	24
9.	Ph 80,2	K 0,7 g	3,73	—	1,11	—	57,6	32,4	24
10.	Ph 82,0	KPr	4,35	2,03	—	1,51	67,1	44,5	24
11.	PC 10,9	T 1,0 mg	33,8				87,0		24
12.	PC 12,6	K 0,7 g	40,6				100		24
13.	PC 10,5	K 0,7 g	40,6				100		24
14.	PC 10,2	K 0,7 g	31,4				80,8		24

Es zeigte sich, daß 9,5 mg Takadiastase der Glycerophosphatasewirk-samkeit von 0,7 g Trockenpräparat entsprechen. Wie aus den in Tab. 9, Versuch Nr. 4—7, zusammengestellten Versuchsergebnissen zu ent-nehmen ist, war selbst nach 24stündiger Bebrütung bei dieser Taka-diastasemenge (bei pH 4,0) nur eine geringfügige Hydrolyse des Phos-phatids zu beobachten, während in der gleichen Zeit das Karotten-präparat mit der gleichen glycerophosphatatischen Aktivität eine Auf-spaltung des Phosphatids zu 57,6% bewirkte (Versuch Nr. 9). Diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, daß zur Abspaltung von Cholin aus Phosphatiden ein anderes Enzym — eben eine Phospho-diesterase — erforderlich ist als für die Hydrolyse der Glycerin-Phosphorsäurebindung in Glycerophosphat. Wenn auch dieser Befund bei den festgestellten großen Unterschieden im Spaltungsgrad dieser Annahme hohe Wahr-scheinlichkeit verleiht, so ist er doch insofern nicht streng beweisend, als man einwenden könnte, daß die Phosphatase aus Takadiastase nicht mit derjenigen aus Karotten identisch zu sein brauchte, wobei dann der vorhandene Unterschied bei der Anwendung auf ein anderes Substrat, nämlich Phosphatid, deutlich werden könnte.

Daß das phosphatidsplattende Ferment identisch sein könnte mit der Glycero- oder Cholinphosphatase, erscheint aber auch deswegen un-wahrscheinlich, weil die Phosphatidspaltung weder durch Phosphat-pufferlösung, wie Vergleiche mit Citratpufferlösung zeigten, noch durch Natriumfluorid merklich gehemmt wird.

Überraschenderweise ist das Fermentpräparat aus Karotten auch in der Lage, tertiäre Phosphorsäureester, z. B. Dimethylphosphorsäure-cholinester, zu spalten. Dieser tertiäre Phosphorsäureester wurde nach R. R. RENSHAW und C. Y. HOPKINS dargestellt [14] und in einer Ver-suchsreihe, deren Ergebnisse in Tab. 10 zusammengefaßt sind, der Ein-wirkung von Takadiastase sowie von Karottenenzympräparat unter-worfen. Die Verbindung erwies sich als sehr resistent gegenüber dem

Tabelle 10.

*Einwirkung von Takadiastase und Karottenenzympräparat
auf Dimethylphosphorsäure-cholinester.*

Enzympräparat	abgespaltene Phosphor- menge in % P	Spaltungs- grad %	Zeit Std
Takadiastase	0	0	24
„	0	0	48
Karottenpräparat	0,34	2,7	4
„	2,35	18,8	24
„	2,4	19,2	24
„	3,8	30,2	48
„	3,7	29,6	48

Ferment. Durch Takadiastase war selbst nach 48 Std keine Aufspaltung zu erzielen. Durch Karottenenzym erfolgte eine langsame Abspaltung von Phosphorsäure; der Spaltungsgrad betrug nach 48 Std 30%. Eine Cholinbestimmung ist bei diesen Versuchen unmöglich, weil auch die ungespaltene Verbindung mit den üblichen Cholinreagenzien reagiert.

Zusammenfassung.

1. In Karotten ist ein phosphatidspaltendes Ferment enthalten, dessen Wirkung eingehend untersucht wurde. Als Maß für die Aktivität diente die Menge des in bestimmten Zeiträumen abgespaltenen Cholins, das nach W. ROMAN bestimmt wurde.

2. Die Wirksamkeit der Enzymlösungen ist in erheblichem Maße von der Sorte und dem Reifezustand der zur Herstellung verwendeten Karotten abhängig.

3. Ein durch Vakuumgefriertrocknung gewonnenes Präparat erwies sich als besonders geeignet für enzymatische Untersuchungen, da es auch bei wochenlanger Lagerung seine Wirksamkeit nur unwesentlich änderte.

4. Nach reaktionskinetischen Untersuchungen entspricht der zeitliche Verlauf der Cholinabspaltung demjenigen einer Reaktion 1. Ordnung. Das p_H -Optimum liegt bei p_H 5,8, das an sich sehr flache Temperatur-optimum bei etwa 25—35° C.

5. Extrakte aus gekeimtem Weizen besitzen ebenfalls enzymatische Wirksamkeit, während Preßsäfte aus Spinat unwirksam sind.

6. Experimentelle Ergebnisse aus Versuchen mit verschiedenen Substraten sprechen dafür, daß das Ferment Cholin und nicht Phosphorylcholin abspaltet. Die Versuchsergebnisse machen es weiterhin wahrscheinlich, daß dieses Fermentsystem nicht mit Glycerophosphatase identisch ist, sondern eine spezifische Phospho-diesterase darstellt.

Literatur.

- [1] THIERFELDER, H., u. E. KLENK: Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide, S. 90. Berlin 1930. — [2] FRANCIOLI, M., u. A. ERCOLI: Die Methoden der Fermentforschung von E. BAMANN und K. MYRBÄCK, S. 1685. Leipzig 1941. — [3] AKAMATSU, S.: Biochem. Z. **142**, 186 (1923). — [4] HANAHAN, D. J., and I. L. CHAIKOFF: J. of Biol. Chem. **169**, 699 (1947). — [5] HANAHAN, D. J., and I. L. CHAIKOFF: J. of Biol. Chem. **168**, 233 (1947). — [6] HANAHAN, D. J., and I. L. CHAIKOFF: J. of Biol. Chem. **172**, 191 (1948). — [7] ROSE, W. G.: Food Technol. **4**, 230 (1950). — [8] CHARGAFF, E.: J. of Biol. Chem. **129**, 619 (1939). — [9] ROMAN, W.: Biochem. Z. **219**, 218 (1930). — [10] BEATTIE, F. R. J.: Biochemic. J. **30**, 1554 (1936). — [11] DIEMAIR, W., u. J. KOCH: Z. angew. Chem. **60**, 155 (1948). — [12] CHIBNALL, H. C., and H. J. CHANNON: Biochemic. J. **23**, 168 (1929). — [13] PLIMMER, R. H. A., and W. J. BURCH: Biochemic. J. **31**, 388 (1937). — [14] RENSHAW, R. R., and C. Y. HOPKINS: J. Amer. Chem. Soc. **51**, 953 (1925).

Professor Dr. Dr. W. DIEMAIR, Universitäts-Institut für Lebensmittelchemie,
Frankfurt a. M., Paul Ehrlich-Straße 40.

LEBENS LAUF

Am 11. Januar 1918 wurde ich, Richard Jäger, als Sohn des Steuerberaters Wilhelm Jäger und seiner Ehefrau Hilda, geb. Biewald, in Frankfurt am Main geboren. Ich besuchte die Ziehen-Oberrealschule in Frankfurt am Main-Eschersheim, die ich im Januar 1937 mit dem Zeugnis der Reife verließ, um Chemie zu studieren. Von 1937–1945 war ich zum Wehr- und Kriegsdienst eingezogen.

Meine praktische Ausbildung als Apotheker erhielt ich in der Riederwald-Apotheke zu Frankfurt am Main und bestand im Dezember 1944 in Wiesbaden die pharmaz. Vorprüfung mit der Note „Sehr gut“. Von 1942–1947 studierte ich mit mehrfacher Unterbrechung Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main. Am 18. Dezember 1947 bestand ich dort das Pharmazeutische Staatsexamen mit der Note „Gut“. Vom 1. Januar 1948 bis 28. Februar 1949 war ich als wissenschaftlicher Assistent am pharmaz Institut der Universität Frankfurt am Main tätig. Im Sommersemester 1949 begann ich mit der Durchführung der vorliegenden Arbeit, die ich zu Anfang des Sommersemesters 1951 abschloß.

